

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PROCESS FOR PREPARING CANCER VACCINES

**Patent number:** WO9421808

**Publication date:** 1994-09-29

**Inventor:** BIRNSTIEL MAX L (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT); COTTEN MATTHEW (AT); MAAS GERHARD (AT); PLANK CHRISTIAN (AT); SCHMIDT WALTER (AT); WAGNER ERNST (AT); ZATLOUKAL KURT (AT); SCHAFFNER GOTTHOLD (AT)

**Applicant:** BIRNSTIEL MAX L (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT); COTTEN MATTHEW (AT); MAAS GERHARD (AT); PLANK CHRISTIAN (AT); SCHMIDT WALTER (AT); WAGNER ERNST (AT); ZATLOUKAL KURT (AT); SCHAFFNER GOTTHOLD (AT); BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE); GENENTECH INC (US)

**Classification:**

- **International:** C12N15/87; C12N7/04; C12N5/10; C12N15/44; C12N15/47; A61K48/00; A61K47/48; C12N15/23; C12N15/26

- **european:** C12N15/87, A61K39/00D6, A61K47/48, A61K48/00, C07K14/11, C07K14/145, C07K14/485, C07K14/535, C07K14/55, C07K14/57, C07K14/705, C12N7/04, C12Q1/70B

**Application number:** WO1994EP00859 19940318

**Priority number(s):** AT19930000556 19930319; DE19934326821 19930810

**Also published as:**

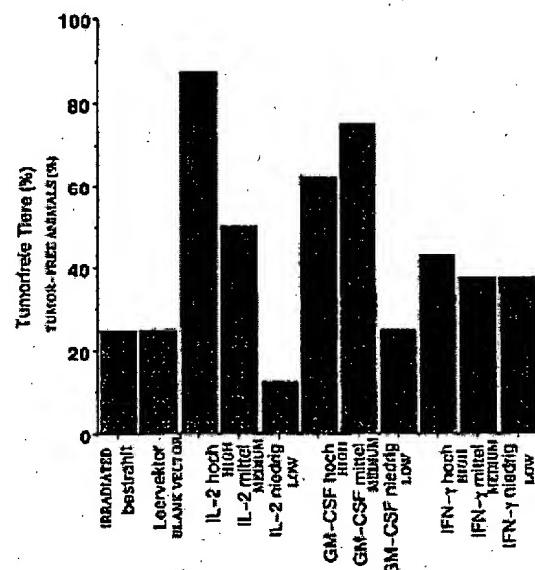
EP0689604 (A)  
FI954383 (A)

**Cited documents:**

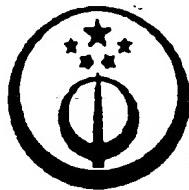
EP0545016

### Abstract of WO9421808

Cancer vaccines are prepared by treating tumor cells or fibroblasts with a complex of immunostimulating polypeptide-coding DNA and of DNA-binding substance, for example polylysine, preferably conjugated with transferrine. The complex further contains a conjugate of DNA-binding substance and of an endosomolytic peptide or an adenovirus having at least one E4 defect or one E1a defect associated with other genetic defects.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



## [12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94191520.4

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

[43]公开日 1996年3月27日

C12N 15/87

[22]申请日 94.3.18

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商

[30]优先权

标事务所

[32]93.3.19 [33]AT[31]556/93

代理人 杜京英

[32]93.8.10 [33]DE[31]P4326821.8

C12N 7/04 C12N 5/10

[86]国际申请 PCT/EP94/00859 94.3.18

C12N 15/44 C12N 15/47

[87]国际公布 WO94/21808 德 95.9.29

A61K 48/00 A61K 47/48

[85]进入国家阶段日期 95.9.19

// C12N15/23,C12N15/26

[71]申请人 柏伦格-英格海姆国际股份公司

地址 联邦德国英格海姆

共同申请人 金内泰克公司

[72]发明人 M·L·伯恩施蒂尔 M·布希利

M·科顿 G·马斯 C·普朗克

G·沙夫纳 W·施密特

E·瓦格纳

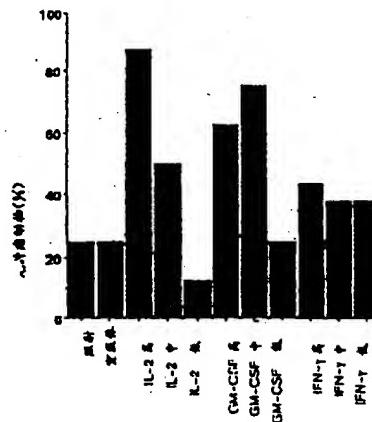
K·扎特洛卡尔

权利要求书 7 页 说明书 89 页 附图页数 30 页

[54]发明名称 肿瘤疫苗的制备方法

[57]摘要

用免疫刺激多肽的编码 DNA 和 DNA 结合物如优选与转铁蛋白偶联的聚赖氨酸的复合物处理肿瘤细胞或成纤维细胞制备肿瘤疫苗。该复合物进一步含有 DNA 结合物与核内体裂解肽或含有与其它遗传缺陷有关的至少一种 E<sub>4</sub> 缺陷或一种 Ela 缺陷的腺病毒的偶联物。



## 权利要求书

1. 制备含自身肿瘤细胞的肿瘤疫苗的方法，其特征在于培养肿瘤细胞或成纤维细胞，培养细胞在体外用含有下列成份的组合物进行转染：

ai) 含有一种或多种在细胞中可表达序列的一种 DNA 分子，该序列编码一种或多种相同或不同的免疫刺激多肽，或者含有不同免疫刺激多肽的编码序列的若干 DNA 分子；

a ii) 不含编码在被转染的细胞中有功能活性多肽的序列的另一可选择的 DNA 分子；

b) DNA 结合分子和一种选自下组的核内体裂解作用剂的偶联物：

i) 至少在 E<sub>1</sub> 区突变的腺病毒，

ii) 除了 E1a 区缺陷外，有一个或多个其它遗传缺陷的腺病毒，或

iii) 核内体裂解活性肽；

可选择地，

c) 优选与内在化因子偶联的 DNA 结合分子，其中内在化因子与被转染细胞表面分子结合并被内在化于这些细胞中；

组分 b) 和 c) 与 a) 中限定的 DNA 形成一种基本电中性的复合物，

使转染细胞失活，保留表达 ai) 限定的 DNA 的能力，丧失分

裂能力，当转染成纤维细胞时，将后者与未转染并失活的瘤细胞混合，任选将细胞群与药用赋型剂和载体混合。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 是一种表达质粒，其含有编码细胞因子的一种或多种序列。

3. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有编码人白细胞介素 2 的序列。

4. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有编码人干扰素  $\gamma$  的序列。

5. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于两种质粒用作 ai) 所限定的 DNA，其中一种含有编码人白细胞介素 2 的序列，另一种含有编码干扰素  $\gamma$  的序列。

6. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的编码序列。

7. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于 ai) 中所限定的 DNA 是一种含有一种或多种编码共刺激分子的序列的表达质粒。

8. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于 DNA 含有一种编码热稳定抗原的序列。

9. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 是一种含有一种或多种编码新抗原的序列的表达质粒。

10. 根据权利要求 9 的方法，其特征在于新抗原是一种病毒蛋白或其片段。

11. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于病毒蛋白是狂犬病毒糖蛋白。

12. 根据权利要求 2-11 之一的方法，其特征在于另外使用

质粒作为 aii) 中限定的一种 DNA 分子，其不含有编码在转染细胞中有功能活性多肽的序列。

13. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于一种聚赖氨酸，其链长优选为 200—300 个赖氨酸基团，用作 DNA 结合分子 b) 和任选的 c)。

14. 根据权利要求 13 的方法，其特征在于 c) 中聚赖氨酸与作为内在化因子的人转铁蛋白偶联。

15. 根据权利要求 13 的方法，其特征在于 c) 中聚赖氨酸与作为内在化因子的人表皮生长因子(EGF)偶联。

16. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于一种偶联物用作 b) 组分，它含有至少在 E<sub>1</sub> 区有缺陷的腺病毒。

17. 根据权利要求 16 的方法，其特征在于名为 dl1014 的腺病毒用作 E<sub>1</sub> 变株。

18. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于作为组分 b) 使用一种偶联物，它含有一种 E<sub>1a</sub> 区缺陷，并用补骨脂素/紫外失活的腺病毒。

19. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于 b) 组分使用一种偶联物，它含有一种已被  $\beta$ -丙内酯失活的腺病毒。

20. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于一种偶联物用作 b) 组分，其中肽序列 SEQ. ID NO:7 以离子键与聚赖氨酸相连。

21. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于被转染细胞用 X—射线或  $\gamma$ —射线失活。

22. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于肿瘤细胞为黑色素瘤细胞。

23. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于肿瘤细胞是结肠癌细胞。

24. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于成纤维细胞被转染并失活。

25. 根据权利要求 24 的方法，其特征在于成纤维细胞是自体的成纤维细胞。

26. 根据权利要求 24 的方法，其特征在于成纤维细胞是一种成纤维细胞系的细胞。

27. 根据权利要求 24—26 之一的方法，其特征在于被转染并失活的成纤维细胞与自体的失活瘤细胞相混合。

28. 根据权利要求 27 的方法，其特征在于瘤细胞是黑色素瘤细胞。

29. 根据权利要求 27 的方法，其特征在于瘤细胞是结肠癌细胞。

30. 可用权利要求 1—29 之一的方法获得的肿瘤疫苗。

31. 制备肿瘤疫苗的转染复合物，其特征在于它含有下列成份：

a) 含有一种或多种可编码一种或多种相同或不相同免疫刺激多肽在细胞中可表达序列的一种 DNA 分子，或者含有编码不同免疫刺激多肽的序列的若干 DNA 分子；

a ii) 任选的另一 DNA 分子，它不含有编码在转染细胞中有功能活性的多肽的序列；

b) DNA 结合分子和一种选自下组的核内体裂解作用剂的偶联物：

- i) 至少在  $E_1$  区突变的腺病毒，
  - ii) 具有一个或多个附加基因缺陷并在  $E1A$  区有缺陷的腺病毒，或
  - iii) 核内体裂解活性肽；  
可选择地
- c) 优选与一种结合于转染细胞表面分子并被内在化于其中的内在化因子偶联的一种 DNA 结合分子，  
组分 b) 和组分 c) 与 a) 中限定的 DNA 形成一种基本电中性的复合物。

32. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 是一种含有一种或多种编码细胞因子的序列的表达质粒。

33. 根据权利要求 29 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有编码人白细胞介素 2 的序列。

34. 根据权利要求 32 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有编码人干扰素  $\gamma$  的序列。

35. 根据权利要求 32 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 含有编码人 GM-CSF 的序列。

36. 根据权利要求 33 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 由两种质粒组成，一种含有编码人 IL-2 的序列，另一含有编码 IFN- $\gamma$  的序列。

37. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 是一种表达质粒，它含有一种或多种编码共刺激分子的序列。

38. 根据权利要求 37 复合物，其特征在于 DNA 含有编码热

稳定抗原的序列。

39. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于 ai) 中限定的 DNA 是含有一种或多种编码新抗原的序列的一种表达质粒。

40. 根据权利要求 39 的复合物，其特征在于新抗原为一种病毒蛋白或其片段。

41. 根据权利要求 40 的复合物，其特征在于病毒蛋白是狂犬病毒糖蛋白。

42. 根据权利要求 31 至 34 之一的复合物，其特征在于它还含有一种作为 aii) 中限定的 DNA 分子的质粒，该质粒不含在转染细胞中有功能活性多肽的编码序列。

43. 根据权利要求 31—42 之一的复合物，其特征在于 DNA 中基本不含脂多糖。

44. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于它含有作为 DNA 结合分子 b) 和任选的 c) 的一种聚赖氨酸，其优选链长为大约 200—300 个赖氨酸。

45. 根据权利要求 44 的复合物，其特征在于 c) 的聚赖氨酸与作为内在化因子的转铁蛋白偶联。

46. 根据权利要求 44 的复合物，其特征在于聚赖氨酸与作为内在化因子的人 EGF 偶联。

47. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于它含有作为组分 b) 的一种含至少在 E<sub>1</sub> 区有缺陷的腺病毒的偶联物。

48. 根据权利要求 47 的复合物，其特征在于它含有名为 dl1014 的腺病毒作为 E<sub>1</sub> 突变株。

49. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于它含有作为组分

b) 的一种含有由  $\beta$ -丙内酯失活腺病毒的偶联物。

50. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于它含有作为组分 b) 的一种含有 E1a 缺陷并被补骨脂素/紫外失活的腺病毒的偶联物。

51. 根据权利要求 31 的复合物，其特征在于它含有作为组分 b) 的一种其中序列为 SEQ 1D NO.7 的肽以离子键与聚赖氨酸结合的偶联物。

52. 以权利要求 31—51 之一限定的一种复合物转化的人肿瘤细胞。

53. 以权利要求 31—51 之一限定的一种复合物转化的人成纤维细胞。

54. 根据权利要求 53 的成纤维细胞，其与人肿瘤细胞混合。

55. 含有根据权利要求 52 或 54 的细胞和药用营养和赋型剂的药物制剂。

的”。此外，能产生病毒的包装细胞株虽然可以弥补 Ad5dl 312 的缺陷，但是并不令人满意。

本发明的目的是在改进基因转移体系基础上，提供一种制备肿瘤疫苗的方法。

因此本发明涉及到一种制备肿瘤疫苗的方法。这种疫苗包含有自身的肿瘤细胞。该方法的特征在于培养肿瘤细胞或成纤维细胞，培养的细胞用含下列成份的组合物进行体外转染：

a) 含有一种或多种能在细胞中表达的编码一种或多种相同或不同的免疫刺激多肽的 DNA 分子，或者多种含有编码不同免疫刺激多肽的序列的 DNA 分子，

a ii) 任选的另一 DNA 分子它不具有编码在转染细胞里有功能活性多肽的序列，

b) DNA 结合分子与选自下组的核内体裂解作用剂的偶联物：

i) 至少在 E4一区突变的腺病毒，

ii) 具有除了 E1A 区缺陷外的其他遗传缺陷的腺病毒，或者

iii) 核内体裂解的活性肽，

任意地

c) 一种优选与内在化因子偶联的 DNA 结合分子，内在化因子结合于欲转染的细胞表面分子，并且被内在化至细胞内，

组分 b) 和 c) 与在 a) 定义的 DNA 一起形成一种基本上电中性的复合物，灭活被转染细胞使它们失去分裂能力同时保留其表达

a i) 中定义的 DNA 的能力，当转染成纤维细胞时，后者和非转染并且失活的肿瘤细胞相混合，细胞群可以任意与药学上可以接受的赋形剂和载体相混合。

些疫苗是药物制剂,它们含有转染的肿瘤细胞或转染的成纤维细胞,其以药学上可接受的配方与瘤细胞混合。

即用的肿瘤疫苗优选采用悬液形式,这是任选通过胰蛋白酶水解后得到的。细胞悬浮在一种生理液中(生理盐水或缓冲液),其中含有适当的营养物,特别是细胞要求的氨基酸,以维持在制备疫苗和临床使用的短期内代射要求。

本发明范围内的实验,将黑色素瘤细胞培养于加有胎牛血清(FCS)的 RPM1640 培养液中。

根据本发明,为了治疗目的,试验了多种培养液以制备肿瘤疫苗的盖仑制剂。

已发现,含有添加剂如牛血清,人血清,人血清白蛋白和/或羟乙基纤维素的细胞培养液可以保证疫苗含有足够数量的活细胞。最适肿瘤疫苗培养液最好采用 AB型血清,也可采用自体的血清。如果需要,培养液中含有加入的一定量生长因子或细胞因子如干扰素 $\gamma$ 或 GM-CSF 以对细胞的抗原递呈起有利的作用。

采用本发明方法制备的肿瘤疫苗类型在细胞因子治疗领域构成了新的发展。其优点在于由于细胞因子作用和其形成的局限性而避免了系统施用细胞因子出现的严重付作用。除了治疗黑色素瘤、结肠癌外,也可以用本发明的肿瘤疫苗治疗其他类型肿瘤,如肾癌或乳腺癌。

图 1;基因转入培养的初生黑色素瘤细胞。

图 2;确定与基因转移复合物的吸收相关的配体。采用非偶联的聚赖氨酸。

图 3;采用补骨脂素/紫外失活腺病毒对初生人黑色素瘤基因

性 DBA/2 鼠。在 24 和 48 小时后，杀死雌鼠 3 只，雄鼠 3 只，分离出生殖细胞。PCR 结果表明，DNA 不转入生殖细胞。

### 实施例 16

#### a) 试验肿瘤疫苗，对于抗转移的保护作用（治疗鼠模型）

在本实施例中，考虑到使用的转染复合物，采用实施例 8 同样的步骤培养细胞和进行转染。所有动物均为 C57BL/6J 品种，每组用 8 只动物。采用的黑色素瘤细胞为 B16—F10，与所用动物品种同源。（NIH, DCT Tumor Depository; Fidder 等 1975）。

在第一天静脉注射  $1 \times 10^5$  活 B16—F10 细胞至实验动物，以形成转移。在第 4, 11 和 17 天，皮下注射肿瘤疫苗，以达到抗转移免疫。

每次注射  $1 \times 10^5$  照射细胞。疫苗含有不同数量已由细胞因子质粒转染过的细胞（以下“转染细胞”表示已经转染处理的细胞；细胞因子表达值以每只鼠在 24 小时的值表示；所用术语见图 25）：

##### 1) 对照：

a) 只进行了照射的细胞（照射的）

b) 用空载体 pSP 转染的照射过的细胞（空载体）

##### 2) 用 IL-2 质粒转染细胞：

a) 100% 转染细胞（表达：15,000 单位；“IL-2 高”）

b) 20% 转染细胞，80% 非转染细胞（表达：3000—4000 单位；“IL-2 中等”）。

c) 2% 转染细胞；98% 非转染细胞（表达：400 单位，“IL-2 低”）

##### 3) 用 GM-CSF—质粒转染的细胞

a) 100% 转染细胞（表达 500ng；“GM-CSF 高”）

过,但是没有转染的  $1 \times 10^5 M_3$  细胞进行了处理。第二对照组作为肿瘤生长的对照,注射了  $5 \times 10^3 M_3$  细胞。在超过 4 个月的时间里,对动物进行了观察。发现在 2 组已注射细胞的实验组里,作为肿瘤疫苗的细胞因子 V 80% 动物自动被保护不长肿瘤。在第一对照组里,所有动物在 8 周内长瘤。第二对照组除了一只外,所有动物均长瘤。

#### 实施例 17.

在预防小鼠模型中,肿瘤疫苗起细胞因子的给药作用,在这一实施例中,考虑到所使用的转染复合物,采用了与实施例 8 相同步骤的细胞培养和转染方法。采用 DBA/2 小鼠和  $M_3$  黑色素瘤细胞。所用的细胞因子质粒与实施例 16 相同。按实施例 8 进行免疫,为了接种肿瘤(“攻击”)用  $3 \times 10^5$  细胞而不是用  $1 \times 10^5$  细胞。转染细胞和只照射过细胞的混合比例以及表达值和实施例 16 相当。在进行“攻击”后,对动物进行了 8 周肿瘤生长观察,这些实验结果见图 26。

#### 实施例 18.

采用核内体裂解肽制备肿瘤疫苗。

##### a). 合成肽 INF5。

名为 INF5 (SEQID. No:7) 的肽,是用 20mg TentaGel S-PHB 树脂 (Rapp polymer; 0.27mM/g) 作为固相,采用 HBTU 活化方法合成的 (Knorr 等, 1989, 1mM)。第一个偶联的氨基酸是  $N-\alpha-N-\Sigma-Fmoc$ -赖氨酸。从而形成了以 C 末端赖氨酸为连接氨基酸的头对头二聚体。(采用下列侧链保护基团: (Trt)Asn, (Trt)Cys 或 (E-Bu)Cys, (t-Bu)Glu, (Trt)His, (t-Bu)Ser。用